

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20560702

研究課題名 (和文) 糖類アモルファスマトリクスのゼロモビリティ温度に基づく不安定物質の超高度安定化

研究課題名 (英文) Extraordinarily High Stabilizing Effect of Amorphous Sugar Matrix at Temperatures below Zero-Mobility Temperature

研究代表者

今村 維克 (IMAMURA KOREYOSHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：70294436

研究成果の概要 (和文)：糖によって形成されたアモルファスマトリクスは、不安定物質を包括安定化する働きがある。一方、申請者は糖分子の赤外線吸収 (IR) スペクトルの温度依存性から T_g より数十℃低いある温度 (T^*) に糖分子間水素結合が高度に維持される温度域が存在することを見出した。この T^* 以下の温度領域では、糖分子のモビリティが極端に制限され、マトリクス内に包括した酵素の失活が T^* を境として顕著に大きくなることがわかった。さらに、種々の糖類からなるアモルファスマトリクスの T^* を測定するとともに T^* を上昇させる物質の探索を行った。

研究成果の概要 (英文)：An amorphous matrix, comprised of sugar molecules, is known to stabilize labile substances such as proteins against chemical and physical degradations. On the other hand, this study revealed that a critical temperature, T^* , exists, below which the disruption of sugar-sugar hydrogen bonds due to increasing temperature was substantially decreased relative to that at temperatures above the T^* . In order to determine whether T^* is the boundary temperature for achieving minimum molecular mobility, the relationship between T^* with the mobility of sugar molecules in an amorphous matrix was investigated based on the structural relaxation behavior of amorphous sugar matrices at different temperatures. Furthermore, the T^* values and the storage-stabilities of a protein for several types of sugars were examined and compared.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：糖アモルファス，水素結合，安定化，乾燥，モビリティ，赤外線スペクトル

1. 研究開始当初の背景

製品製造プロセスにおいて“保存”とは，単なる原料や製品の保管ではなく，その物質／製品の機能の経時的劣化を抑制する操作である．とりわけ，食品・医薬品には，易酸化性の物質やタンパク質のように容易に変性・失活する物質が含まれることが多い．従って，より高度な“保存”を可能にする技術の開発は製品寿命を左右する極めて重要な課題である．一方，食品・医薬品分野における不安定物質の安定化手法の一つとして，糖によって形成されたアモルファスマトリクスに不安定物質を包括させる技術が知られている．しかし，糖類アモルファスマトリクスを構成する糖分子の運動はガラス転移温度以下でも僅かながら残留しており，不安定物質の劣化反応を完全に停止することはできない．そのため，数年に及ぶ長期的な保存を必要とする場合は液体窒素や超低温冷凍機(-80°C以下)に頼らざるを得ないのが現状である．

2. 研究の目的

ガラス転移温度以下でも糖分子の小規模な運動は生じているが，さらに温度を下げたらどうなるか？本研究では，まず，温度走査フーリエ変換赤外分光分析システム(TS-FTIR)を用いて，0°C以下の低温度領域における糖分子間水素結合の形成特性を調べた．その結果，ガラス転移温度よりもさらに30~50°C低温側のある温度(T^*)以下の領域ではマトリクスを構成する糖分子の運動がほぼ完全にFreezeすることを見いだした．そこで，種々の糖からなるアモルファスマトリクスについて，マトリクスに包括された不安定物質(酵素)の劣化

(失活)速度の温度依存性とともにより， T^* を測定した．さらに T^* を測定するとともに，を上昇させる添加物のスクリーニングを行った．

3. 研究の方法

糖として Trehalose などの数種類のオリゴ糖を取り上げた．タンパク質としては，Alkaline phosphatase (ALP, from Calf intestine)を用いた．TSFTIR分析は既報(Imamura et al., *J. Phys. Chem. B*, (2006) **110**, 15094)に従い，昇温セルを用いた温度走査と透過FTIR測定を組み合わせるにより，行った．また，アモルファスマトリクスにおける糖分子のモビリティは，示差走査熱分析(DSC)によりガラス転移温度 (T_g)近傍の吸熱量の経時変化から評価した(Hancock et al., *Pharm. Res.*, (1995) **12**, 799)．

糖とタンパク質(ALP)の複合試料は凍結乾燥により作成した．一定温度で0~120日間保存した後，残存酵素活性を測定し，各温度におけるタンパク質の安定性を評価した．

4. 研究成果

TS-FTIRにより様々な温度における糖類アモルファスマトリクスのIRスペクトルの内，糖の水酸基の伸縮振動に起因する吸収バンドのピーク波数を読み出し，温度に対してプロットすると (Fig. 1)，ピーク波数は温度上昇に伴い直線的に増加して行くが， T_g で不連続に折れ曲がり，温度に対してさらに大きな勾配で増加した．これは，glass-to-rubber転移により糖分子の運動が顕著になり，糖分子間水素結合の消失がより顕著になるためである．ここで， T_g 以下の定温度領域に着目すると， T_g で見られたような勾配の変化が T_g

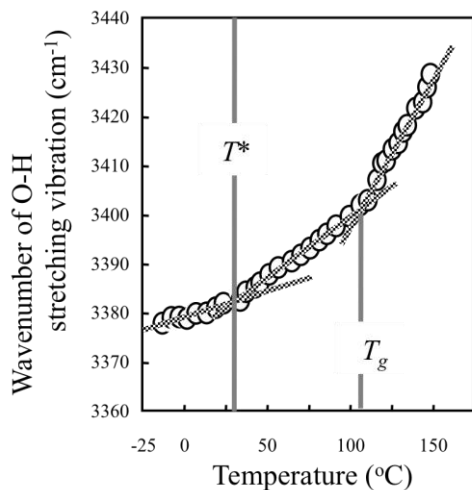


Fig. 1. Temperature dependences of wavenumber due to O-H stretching vibration for amorphous trehalose

の50~100°C低温のある温度で現れた (Fig. 1, T^*)。この T^* 以下の温度域では、糖分子間の水素結合が極めて安定に存在し、温度上昇に伴う水素結合の消失がほとんど生じない。この T^* の物理的意味を明らかにするため、異なる温度における構造エンタルピーの緩和過程とアモルファスマトリクス内に包埋した酵素の保存安定性を測定した。ここで、構造エンタルピーの緩和速度はマトリクスを構成する糖分子のモビリティに対応すると考えられている。その結果、 T^* 以下では糖分子のモビリティはほぼ完全に消失し、マトリクスに包埋された酵素の失活もほぼ完全に停止することが分かった (Fig. 2)。一方、以前から、 T_g 以下の温度域における非晶質状態の分子の運動性については多くの研究がなされており、その過程で分子の運動がほぼ完全にフリーズする温度域が存在することが示唆されていた (Kauzmann, *Chem. Rev.* (1948) **43**, 219; Angell, *Science*, (1995) **267**, 1924)。sucrose および trehalose からなるアモルファスマトリクスの T_k および T_0 として報告されている値 (Angell, *Science*, (1995) **267**, 1924; Shamblin et al., *J. Phys. Chem. B* (1999) **103**, 4113) は、 T^* とほぼ一致した。以上のことから T^* は糖分子のモビリティが消失する

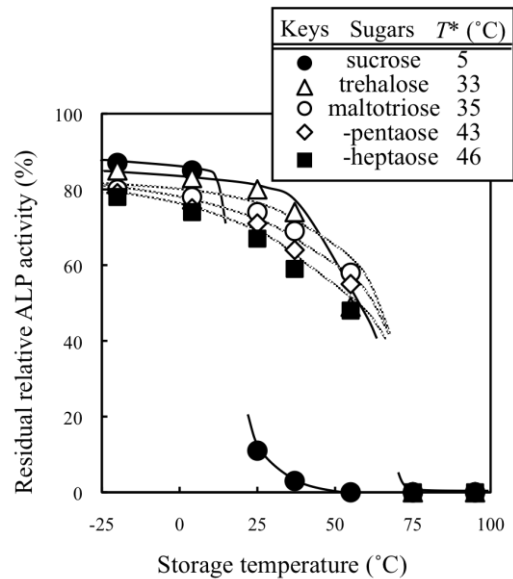


Fig. 2 Relationships between remaining enzyme (ALP) activity in amorphous sugar matrix after 120 days and storage temperature for different types of sugars. Vertical axis means the relative value to the ALP activity immediately after freeze-drying.

温度であり、その温度は TS-FTIR 分析により一義的に同定できるものと考えられる。

さらに種々の糖類からなるアモルファスマトリクスの T^* を測定するとともに T^* を上昇させる物質の探索を行った。その結果、高分子量の糖ほど T^* は高いが、 T^* 以下の酵素の失活速度が高いことが分かった。また、高分子やタンパク質の添加が顕著に T^* を増加させることが分かった。しかし、それら糖-高分子あるいはタンパク質複合アモルファスマトリクスにおけるモデル酵素の失活速度の温度依存性を調べた結果、高分子・タンパク質の添加により、 T^* 以下の温度域における酵素の失活速度も増加し、タンパク質安定化作用自体が減少することがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. K. Imamura, R. Kagotani, M. Nomura, K. Tanaka, K. Kinugawa, and K. Nakanishi, Influences of compression on water sorption, glass transition, and enthalpy relaxation behavior of freeze-dried amorphous matrices. *International Journal of Pharmaceutics*, 査読有, Vol.408, 2011, pp.76–83.

2. 今村 維克, 糖類アモルファスマトリクスの温度走査フーリエ変換赤外分光分析-相互作用状態の温度依存性-. 熱測定, 査読有, 37巻, 2010, pp. 154–161.

3. K. Imamura, T. Yokoyama, A. Fukushima, M. Kinuhata, and K. Nakanishi. Water sorption, glass transition, and protein stabilizing behavior of an amorphous sucrose matrix combined with various materials. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 査読有, Vol.99, 2010, pp.4669–4677.

4. K. Imamura, M. Nomura, K. Tanaka, N. Kataoka, J. Oshitani, H. Imanaka, and K. Nakanishi, Impacts of compression on crystallization behavior of freeze-dried amorphous sucrose. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 査読有, Vol.99, 2010, pp.1452–1463. [学会発表] (計9件)

1. K. Imamura, Heterogeneities of states and roles of water molecules sorbed in an amorphous sugar matrix. *Proceedings of CORE-TO-CORE World Network Seminar on advanced particle science and engineering*, 2010年11月25日, Kyoto, Japan.

2. 今村 維克, 糖類アモルファスマトリクスにおける分子間相互作用の解析 (招待講演), 第37回食品の物性に関するシンポジウム, 2010年9月4日, お茶の水女子大学.

3. 今村 維克, 籠谷亮, 野村 真世, 今中 洋行, 中西 一弘, フーリエセルフデコンボリューションによる糖類アモルファスマトリクスに収着した水の束縛状態の解析, 日本食品工学会第11回(2010年度)年次大会, 2010年8月5日, 東京海洋大学.

4. 衣川耕史, 籠谷亮, 野村 真世, 今中 洋行, 今村 維克, 中西 一弘, 糖類アモルファスマトリクスの結晶化に及ぼす吸湿・圧縮の影響, 日本食品工学会第11回(2010年度)年次大会, 2010年8月5日, 東京海洋大学.

5. K. Imamura, T. Yokoyama, H. Imanaka, and K. Nakanishi, Extraordinarily high protein stabilizing effect of amorphous sugar matrix at temperatures much below glass transition temperature. 第3回 高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム 抗がん剤・抗感染症創薬のための標的分子探求, 2010年2月3日, 岡山大学.

6. 今村維克, 非晶質食品固体に含まれる収着水の状態および機能の不均一性 (招待講演), (財)飯島記念食品科学振興財団 第22回 学術講演会, 2009年11月24日, 学士会館, 東京.

7. 今村維克, 野村真世, 木村佳文, 伊久珠代, 絹島光倫, 今中洋行, 中西一弘, 糖類アモルファス材料の水分収着特性とタンパク質安定化作用に及ぼす高圧処理の影響, 化学工学会第41回秋季大会, 2009年9月16日, 広島大学.

8. K. Imamura, Temperature scanning Fourier transform infrared spectroscopy analyses of amorphous matrix and amorphous sugar-polymer/protein mixtures (招待講演). 29th Seminar of Advanced Particle Handling Science, 2009年7月11日, Kyoto Univ.

9. 今村 維克, 横山 徹, 木村 佳文, 今中 洋行, 中西 一弘, 糖類アモルファスマトリクスにおける分子間相互作用およびタンパク質安定化作用の温度依存性, 日本食品工学会第9回(2008年度)年次大会, 2008年8月5日, 東京海洋大学.

6. 研究組織

(1)研究代表者

今村 維克 (IMAMURA KOREYOSHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：70294436